

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 21 SEP 2000
WIPO PCT
EPO-Munich
58

23. Aug. 2000

10 / 049265

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

EP 06/07370

4

Aktenzeichen: 199 37 548.8

Anmeldetag: 09. August 1999

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Jülich GmbH,
Jülich/DE;
BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE.

Erstanmelder: Forschungszentrum Jülich GmbH,
Jülich/DE

Bezeichnung: Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung
von Riboflavin

IPC: C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Joost

Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung von Riboflavin

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus zur Herstellung von Riboflavin.

Das Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, 10 Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u.a. Hautschäden, Bindegauentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. 15 Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen 20 Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei allerdings auch relativ kostspielige Ausgangsprodukte - wie beispielsweise D-Ribose - eingesetzt werden müssen.

Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Die mikrobielle Herstellung des Riboflavins eignet sich insbesondere für solche Fälle, in denen eine hohe Reinheit dieser Substanz nicht erforderlich ist. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn das Riboflavin als Zusatz zu Futtermittelprodukten eingesetzt werden soll. In solchen Fällen hat die mikrobielle Herstellung des Riboflavins den Vorteil, daß diese 30 Substanz in einem einstufigen Prozeß gewinnbar ist. Auch können als Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyi* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983, A. Bacher, F. Lingens, Augen. Chem. 1969, S. 393); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien wie *Clostridium*, *Bacillus* und *Corynebakterium* sind zur Riboflavinproduktion geeignet.

Zudem sind Verfahren mit der Hefe *Candida famata* beispielsweise in der US 05231007 beschrieben.

Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene waren aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet. Daher wurden gemäß der WO 93/03183 für die Riboflavin-Biosynthese spezifische Gene aus einem Eukaryonten, nämlich aus *Saccharomyces cerevisiae*, isoliert, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen. Derartige rekombinante Herstellungsverfahren haben für die Riboflavin-Produktion jedoch dann keinen oder nur begrenzten Erfolg, wenn die Bereitstellung von Substrat für die an der Riboflavin-Biosynthese spezifisch beteiligten Enzyme unzureichend ist.

1967 fand Hanson (Hanson AM, 1967, in Microbial Technology, Peppler, HJ, pp.222-250 New York), daß der Zusatz der Aminosäure Glycin die Riboflavin-Bildung von *Ashbya gossypii* steigert. Ein derartiges Verfahren ist jedoch nachteilig, weil Glycin ein sehr teurer Rohstoff ist. Aus diesem Grunde war man bestrebt, durch Herstellung von Mutanten die Riboflavin-Produktion zu optimieren.

Aus der DE 19545468.5 A1 ist ein weiteres Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin bekannt, bei dem die Isocitratlyase-Aktivität oder die Isocitratlyase-Genexpression eines Riboflavin produzierenden Mikroorganismus erhöht ist. Darüber hinaus ist aus der DE 19840709 A1 ein ein- oder mehrzelliger
5 Organismus insbesondere ein Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin bekannt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß einen derart veränderten Glycinstoffwechsel aufweist, daß seine Riboflavinsyntheseleistung ohne externe Zufuhr von Glycin mindestens gleich derjenigen eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10892 ist.

10 Aber auch im Vergleich zu diesen Verfahren besteht noch ein Bedarf, zu einer weiteren Optimierung der Riboflavin-Herstellung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demgemäß, einen ein- oder mehrzelligen
15 Organismus, vorzugsweise einen Mikroorganismus, für die biotechnische Herstellung von Riboflavin zur Verfügung zu stellen, der eine weitere Optimierung der Riboflavin-Bildung ermöglicht. Insbesondere sollte ein Organismus zur Verfügung gestellt werden, der eine Produktion ermöglicht, die gegenüber dem bisherigen Stand der Technik wirtschaftlicher ist. Vor allem soll der Organismus
20 eine im Vergleich zu den bisherigen Organismen erhöhte Riboflavin-Bildung erlauben.

Diese Aufgabe wird durch einen ein- oder mehrzelligen Organismus gelöst, dessen Enzymaktivität der bezüglich NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
25

Das Ziel einer beschleunigten intrazellulären NAD(P)H-Versorgung kann durch Erhöhung der Aktivität eines NAD(P)H-bildenden bzw. Senkung der Aktivität eines NAD(P)H verbrauchenden Enzyms bzw. eine Änderung der Spezifität erreicht werden. Dies läßt sich mit den bekannten Methoden der Stammverbesserung von Organismen erreicht werden. D.h. im einfachsten Falle lassen sich entsprechende Stämme nach der in der Mikrobiologie üblichen Selektion mittels Screening herstellen. Ebenso ist die Mutation mit anschließender Selektion einsetzbar. Die Mutation kann hierbei sowohl mittels chemischer als auch

mittels physikalischer Mutagenese ausgeführt werden. Eine weitere Methode ist die Selektion und Mutation mit anschließender Rekombination. Schließlich lassen sich die erfindungsgemäßen Organismen mittels Genmanipulation herstellen.

- 5 Erfindungsgemäß wird der Organismus derart verändert, daß er intrazellulär NAD(P)H in einer Menge erzeugt, die größer als sein Bedarf für die Aufrechterhaltung seines Metabolismus ist. Diese Erhöhung der intrazellulären NAD(P)H-Erzeugung läßt sich erfindungsgemäß vorzugsweise dadurch erreichen, daß ein Organismus hergestellt wird, bei dem die Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase erhöht ist. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden.

Die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität kann erfindungsgemäß vorzugsweise durch Mutation des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens erhöht werden. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösende Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden, wie Deletion, Insertion und/oder Nukleotid-Austausch.

- 25 Die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression kann durch Einbau von Isocitrat-Dehydrogenase-Genkopien und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression positiv beeinflussen, erreicht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf Transcriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transcriptionssignale erhöht werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl kann beispielsweise das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen zugeordnete regulatorische

Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierender Mikroorganismus, mit dem das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthaltenden Genkonstrukt transformiert.

- 5 Erfnungsgemäß kann die Überexpression der Isocitrat-Dehydrogenase auch durch Austausch des Promotors erzielt werden. Hierbei ist es möglich, die höhere enzymatische Aktivität alternativ durch Einbau von Genkopien oder durch Austausch des Promotors zu erzielen. Gleichermassen ist es jedoch auch möglich, durch gleichzeitigen Austausch des Promotors und Einbau von Genkopien die gewünschte Änderung der Enzymaktivität zu erzielen.
- 10

Die Veränderung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens führt zu einer beschleunigten NAD(P)H-Bildung und zugleich zu einer überraschend hohen Steigerung der Riboflavin-Bildung, wie sie bisher nicht erreichbar war.

- 15 Das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, besonders bevorzugt aus Pilzen, isoliert. Dabei sind Pilze der Gattung Ashbya wiederum bevorzugt. Höchst bevorzugt ist die Spezies *Ashbya gossypii*.
- 20 Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die Sequenz zur Bildung der Isocitrat-Dehydrogenase enthalten, also auch pflanzliche und tierische Zellen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im Isocitrat-Dehydrogenase-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden Plasmids anschließend durch geeignete Schritte mit Restriktionsenzymen in der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Defekte Mutante eingebracht, die auf Funktionalität des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens getestet wird. Funktionelle Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.
- 25
- 30

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die Isocitrat-Dehydrogenase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die angegebene Aminosäure-Sequenz oder deren Allelvariation kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere Derivate, die durch Deletion, Insertion und Substitution von Nukleotiden aus entsprechenden 5 Sequenzen erhältlich sind, wobei die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität erhalten bleibt. Eine entsprechende Sequenz ist in Figur 2b von Nukleotid 1 bis 1262 angegeben.

Den Isocitrat-Dehydrogenase-Genen ist insbesondere ein Promotor der 10 Nukleotidsequenz von Nukleotid -661 bis -1 gem. Abb. 11 oder eine im wesentlichen gleich wirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion und/oder Deletion unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität 15 bzw. die Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt wird. Des weiteren kann der Promotor durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksame Promotoren ausgetauscht werden.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen können des weiteren regulatorische Gen- 20 Sequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Expression bewirken.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. 25 mit oder ohne Regulator-Gen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Gen-Struktur enthalten ist. Durch Klonierung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthalten und zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf 30 dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an

beliebigen Stellen des Genoms integriert werden und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Bei den erfundungsgemäß erhaltenen ein- oder mehrzelligen Organismen kann es
5 sich um beliebige für biotechnische Verfahren einsetzbare Zellen handeln. Hierzu zählen beispielsweise Pilze, Hefen, Bakterien sowie pflanzliche und tierische Zellen. Erfundungsgemäß handelt es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Pilzen, besonders bevorzugt von Pilzen der Gattung Ashbya. Hierbei ist die Spezies Ashbya gossypii besonders bevorzugt.

10 Im folgenden wird die Erfundung näher anhand von Beispielen erläutert, ohne daß damit eine Begrenzung auf den Gegenstand der Beispiele verbunden sein soll:

15 Das Gen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDP3) wurde durch PCR kloniert und dann sequenziert (Sequenz siehe Abb. 11). Die gentechnisch durchgeführte partielle Deletion des Gens durch Austauschmutagenese mit einem Geneticinresistenz-Gen (Abb. 1) wurde durch Southern Blot (Abb. 2) bestätigt. Diese Disruption, d.h. Zerstörung des Gens im Genom des Pilzes, führt dazu, daß der Pilz die davon kodierte Isocitrat-Dehydrogenase nicht mehr bilden kann. Abb. 3 zeigt die 20 Abnahme der Enzymaktivität im Disruptionsstamm AgΔDP3b im Vergleich zum Wildtyp ATCC 10895. In Präparationen der Peroxisomen konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in diesen Organellen lokalisiert ist (Abb. 10). Während die Enzymaktivität in Wildtyp-Peroxisomen deutlich messbar ist, findet sich in den Peroxisomen des Disruptionsstamms keine Aktivität mehr.

25 Die Disruption des Gens führt zu einer deutlichen Verminderung der Vitaminbildung im Vergleich zum Elternstamm (Abb. 4). Wird das Gen dagegen unter Steuerung des starken TEF-Promotors auf einem Plasmid (Abb. 6) in zusätzlicher Kopie in die Ashbya-Zellen gebracht, ist ein deutlicher Anstieg in der Enzymaktivität und der Riboflavinbildung meßbar (Abb. 5).

30 Abb. 7 zeigt, daß bei der Verstoffwechselung ungesättigter Fettsäuren NADPH bei zwei von drei alternativen Reaktionswegen als Reduktionsmittel benötigt wird. Die darin involvierte 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase konnte in Zellen von Ashbya

ebenfalls in Peroxisomen lokalisiert werden (Abb. 8). Die Disruption des IDP3-Gens sollte nun zu einem verringerten Wachstum der Zellen auf Linolsäure oder Linolensäure führen. Das konnte auch gemessen werden (Abb. 9). Damit zeigt sich, daß die Bedeutung der IDP3 für den Stoffwechsel der Zelle in der NADPH-Bildung liegt.

5

10

15

20

25

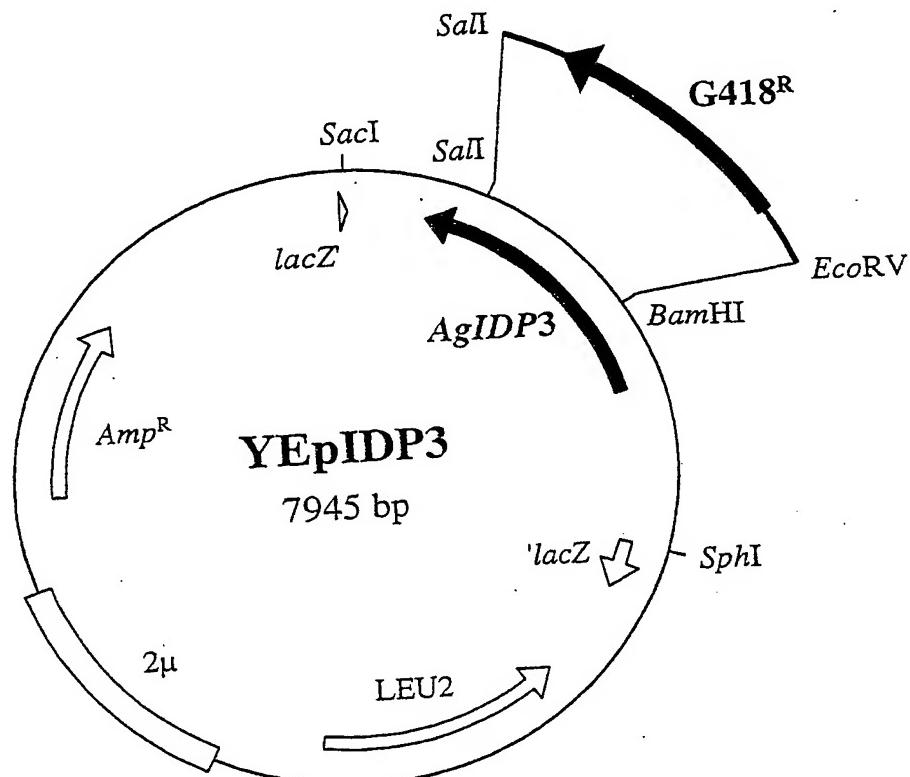


Abb. 1 Schema der Konstruktion des Vektors pIDPkan für den Genaustausch des chromosomalen *AgIDP3*-Gens gegen eine durch Deletion und Insertion des *G418^R*-Gens inaktive Genkopie.

30

5

10

15

20

25

30

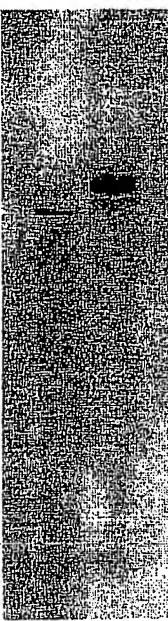
Wildtyp
A.g. Δ IDP3a23.1 —
9.4 —
6.6 —
4.4 —
2.3 —
2.0 —

Abb. 2 Überprüfung der partiellen Deletion und gleichzeitigen Insertion der Geneticin-Resistenz-Kassette am *AgIDP*-Lokus mittels Southern-Blot-Analyse. Genomische, *Sph*I-gespaltene DNA wurde mit einer Digoxxygenin-markierten Sonde hybridisiert.

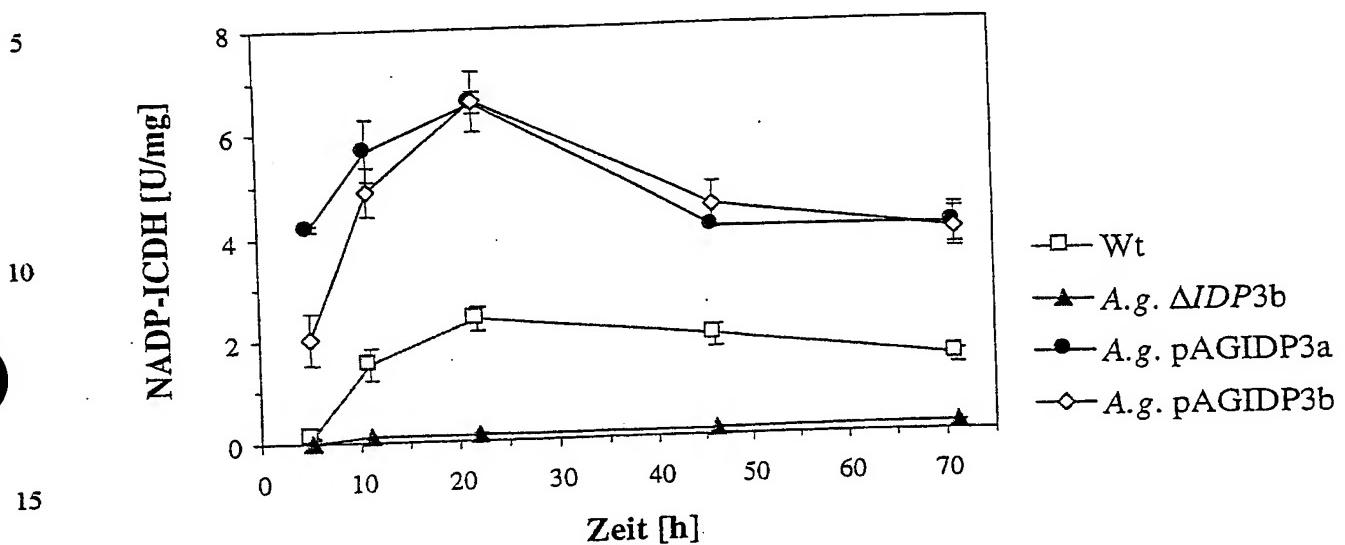


Abb. 3 Vergleich der Enzymaktivitäten der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp, der Mutante *A.g. Δ IDP3b* und den *A.g. IDP*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Wachstum auf Glucose-Vollmedium.

20

25

30

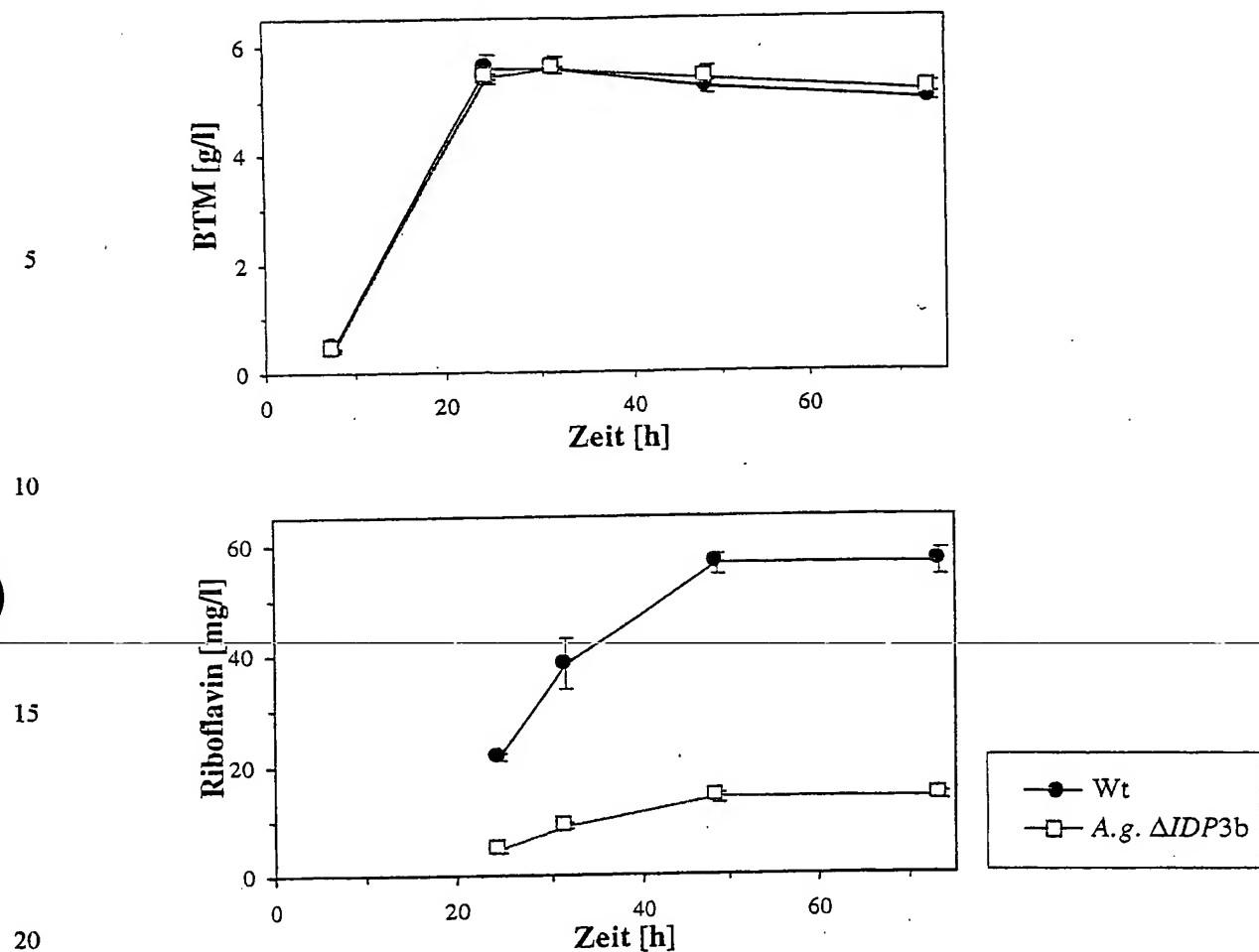
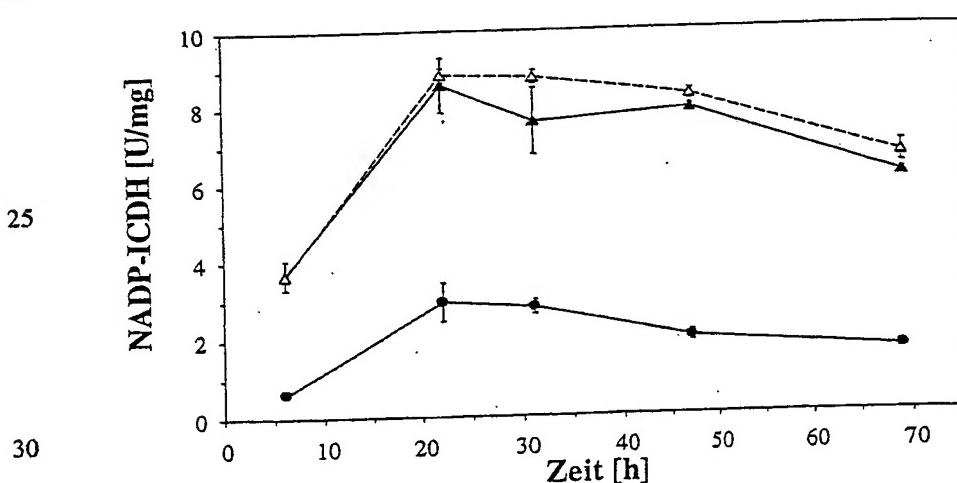
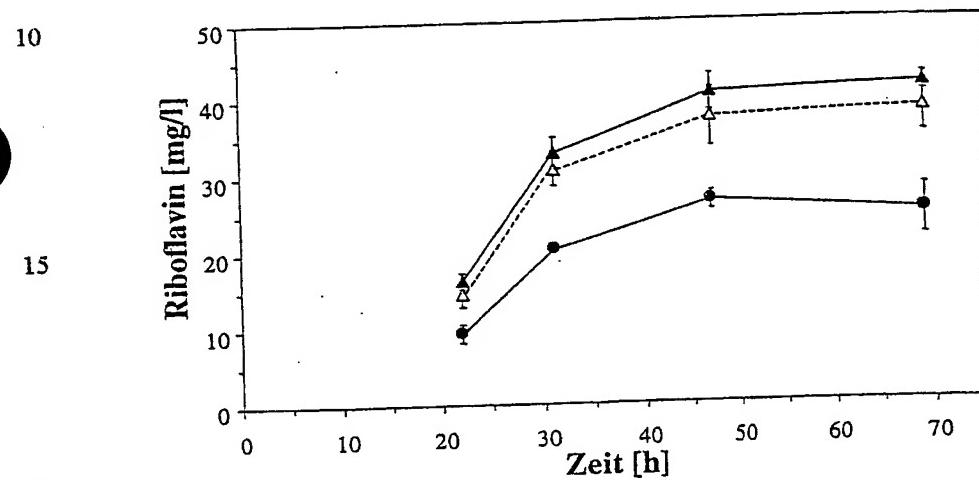
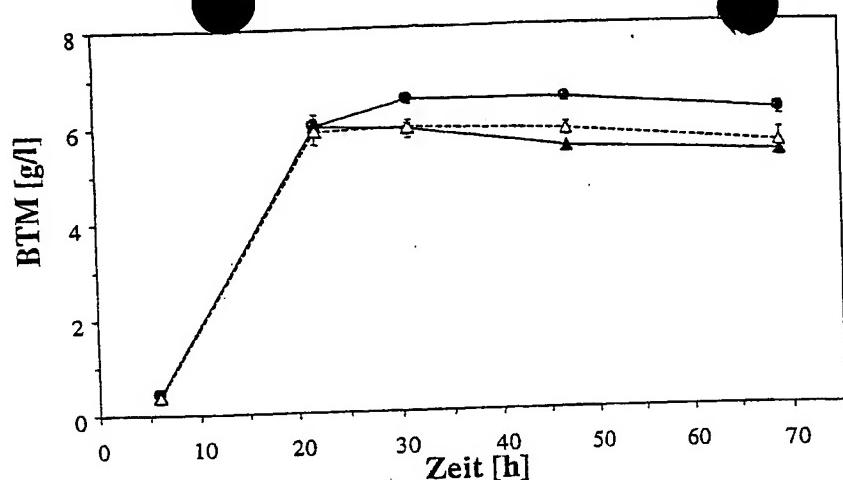


Abb. 4 Vergleich des Wachstums und der Riboflavinbildung vom *Ashbya*-Wildtyp und der Mutante *A.g. ΔIDP3b* bei Wachstum auf Sojaöl-Vollmedium.



- Wt
- ▲ A.g. pAGIDP3a
- △- A.g. pAGIDP3b

Abb. 5 Vergleich des Wachstums, der Riboflavinbildung und der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp und den *AgIDP3*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Kultivierung auf Sojaöl-Vollmedium.

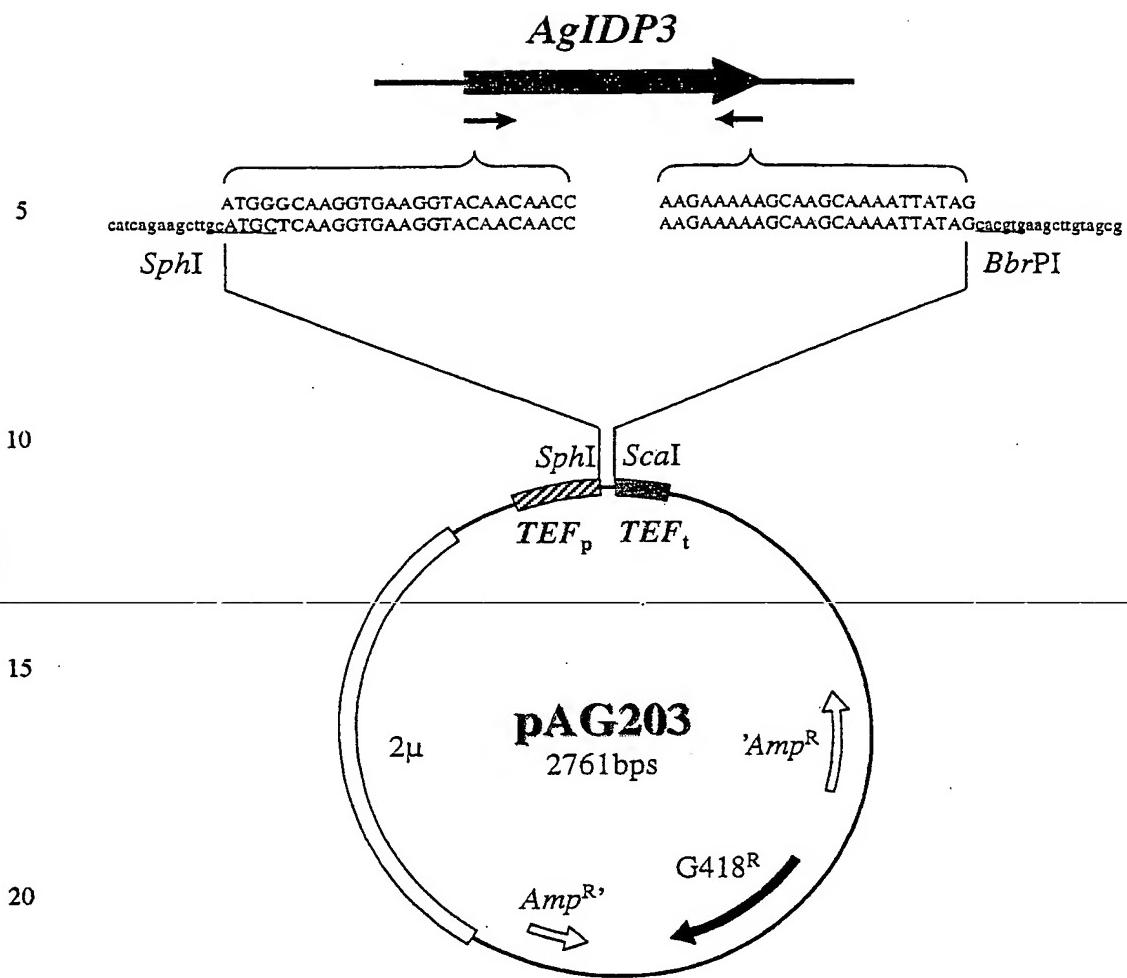
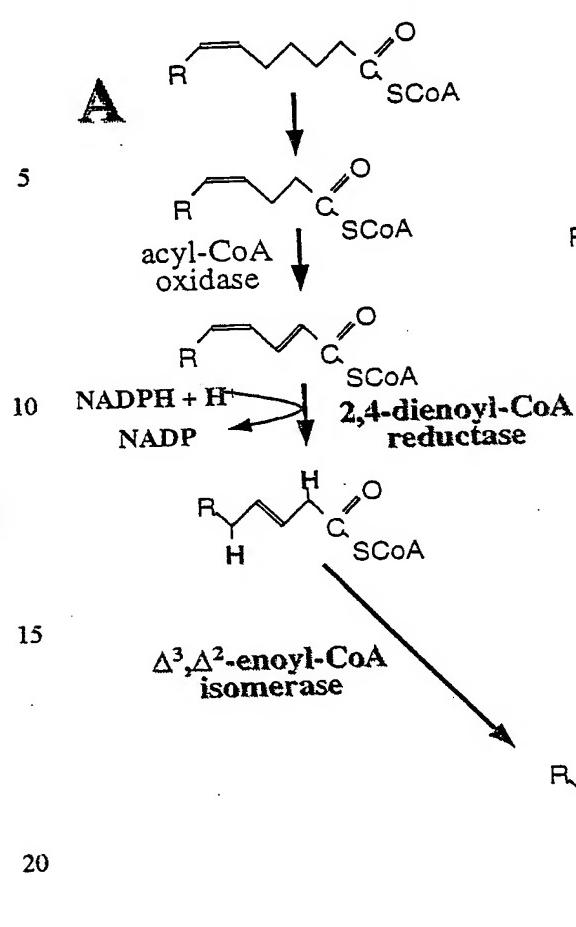


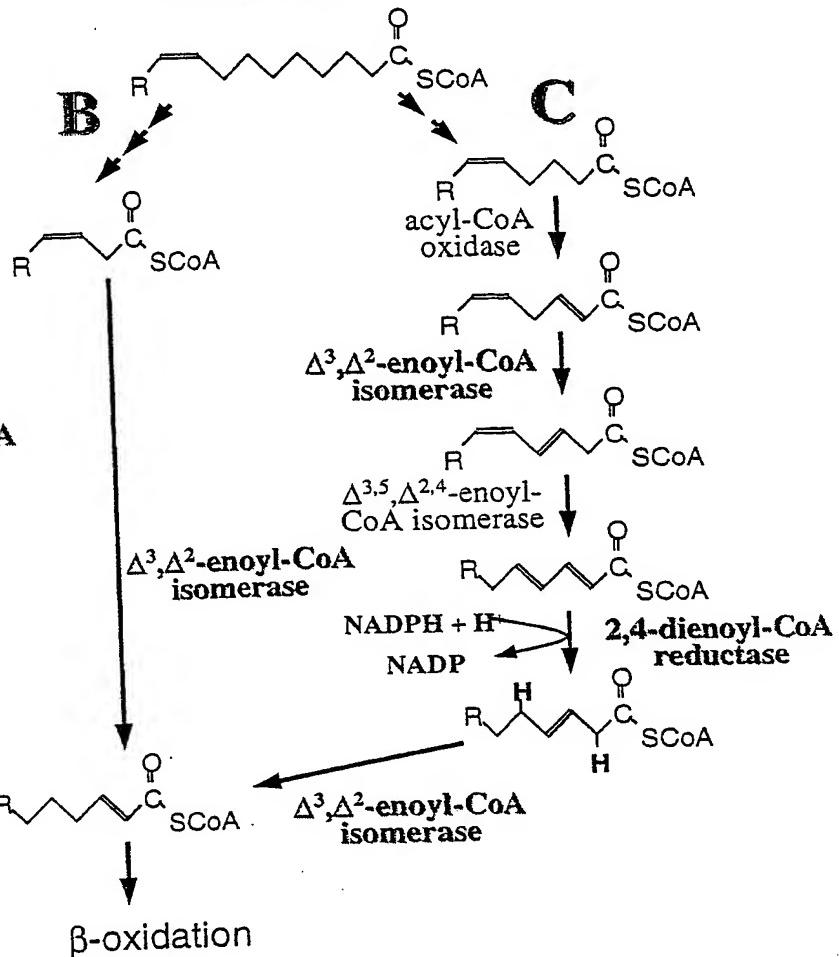
Abb. 6 Plasmid zur Überexpression des *AgIDP3*-Gens unter Kontrolle von *TEF*-Promotor und -Terminator.

Zur Einführung der *SphI*-Schnittstelle war eine Änderung der für die zweite Aminosäure codierenden Nukleotidsequenz notwendig. Es wurde ein konservativer Austausch der Aminosäure Glycin in Leucin vorgenommen.

Petroselinoyl-CoA

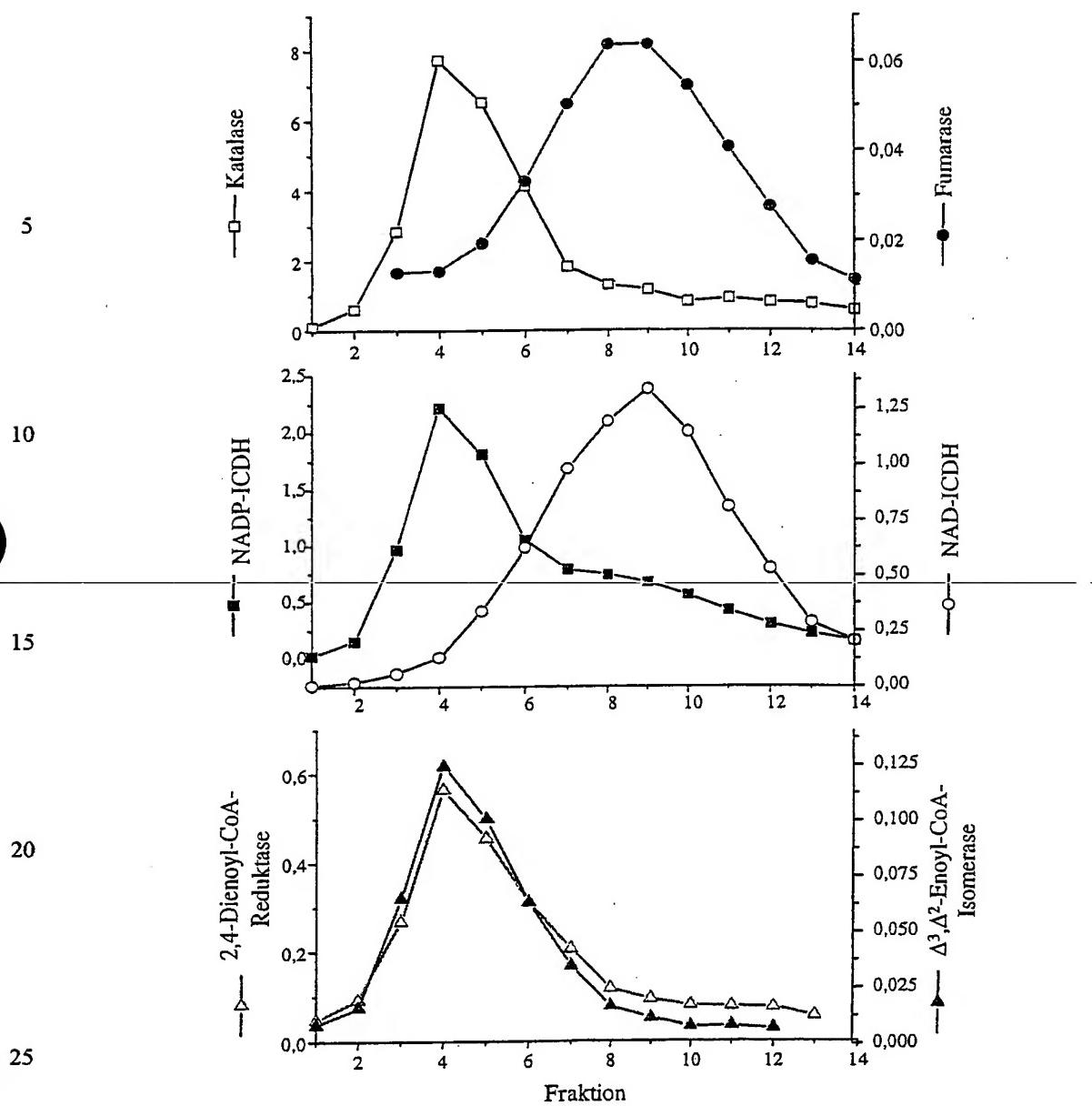


Oleoyl-CoA



25

Abb. 7 Abbauwege ungesättigter Fettsäuren mit Doppelbindungen an geraden (A) und ungeraden (B, C) C-Atomen in Peroxisomen nach Henke *et al.* (1998)

**Abb. 8**

Trennung von aus *Ashbya* Wildtyp isolierten Organellen im Percoll-Dichtegradienten:
Aktivitäten [U/ml] der Markerenzyme Katalase (Peroxisomen) und Fumarase (Mitochondrien), der NAD- und NADP-spezifischen ICDH und der für den Abbau ungesättigter Fettsäuren notwendigen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase und Δ^3,Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase.

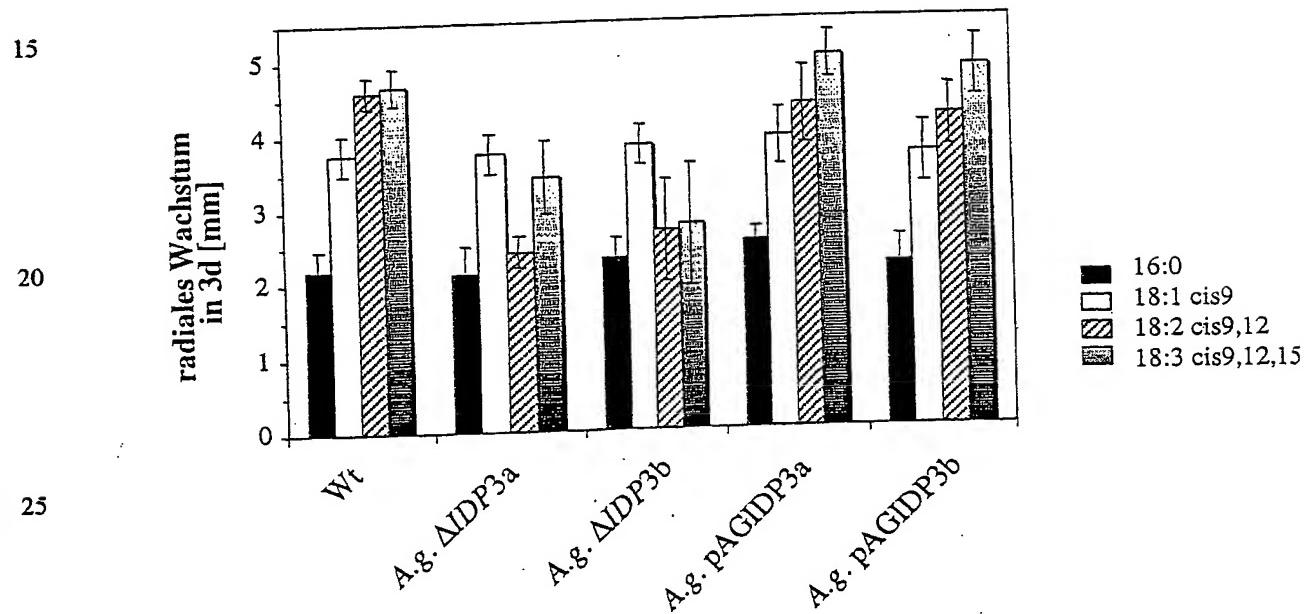
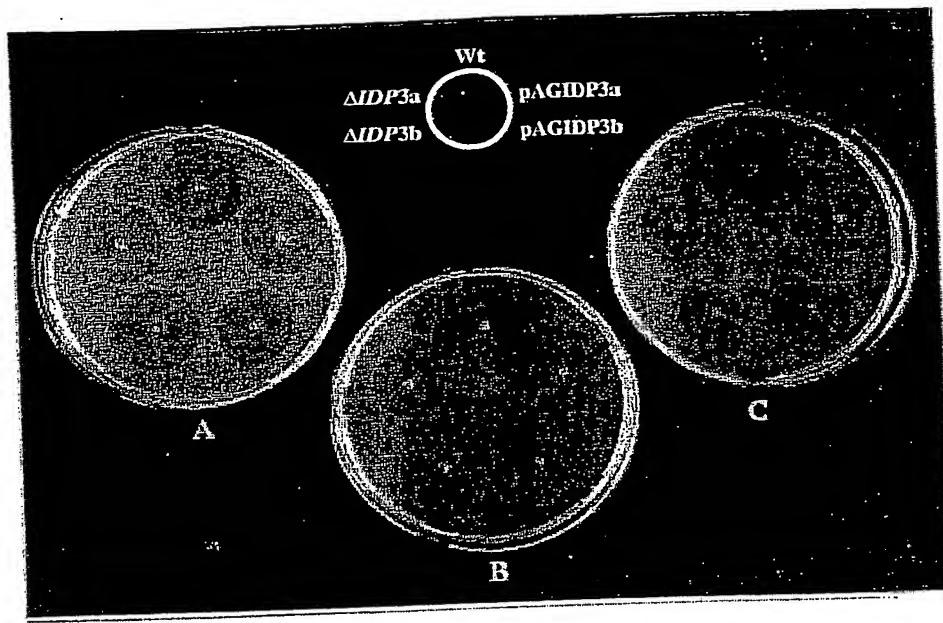
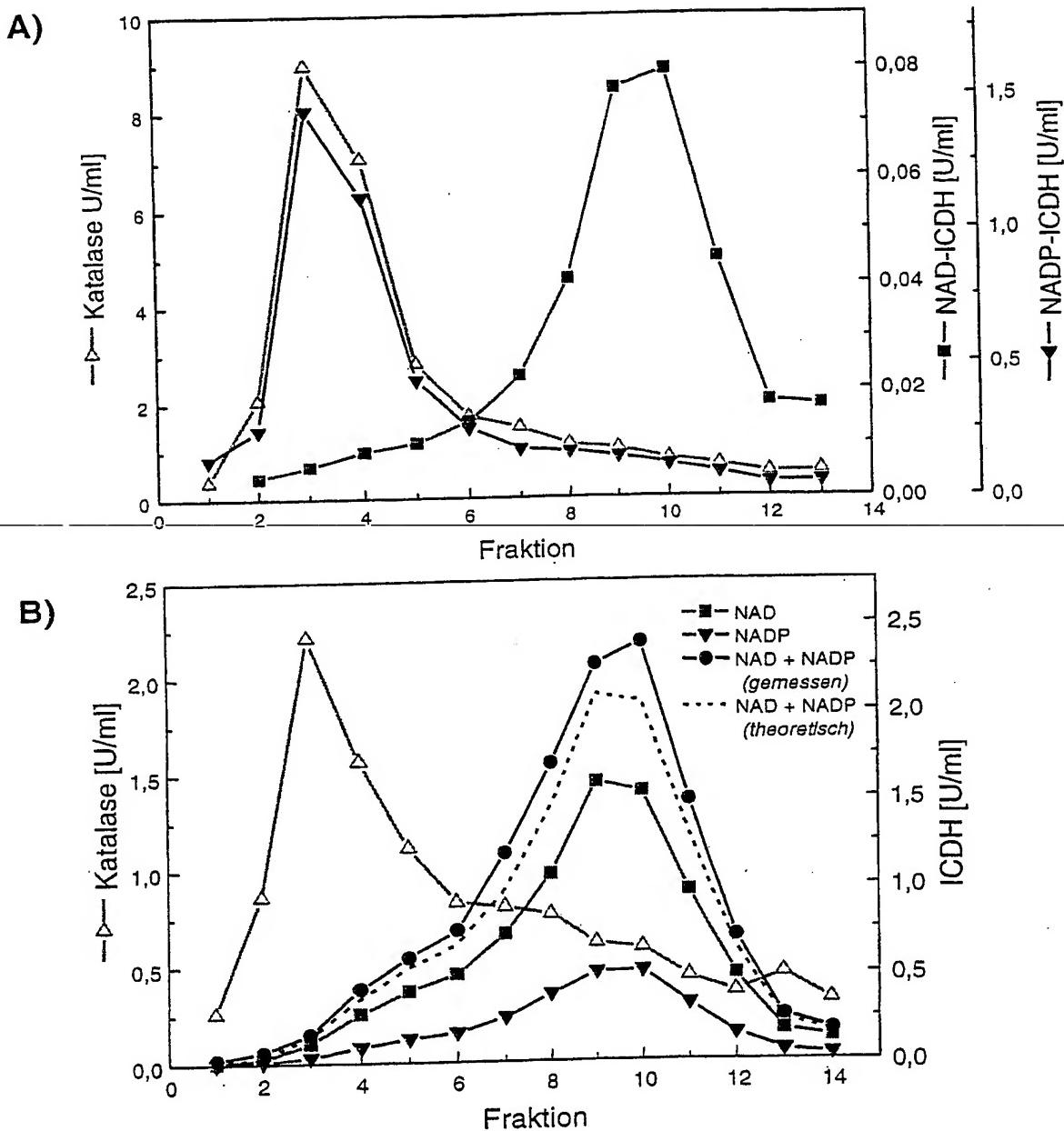


Abb. 9 Vergleich des radialen Wachstums von *Ashbya*-Wildtyp, der Mutanten *A.g.* Δ IDP3a und *A.g.* Δ IDP3b und den Überexprimierern *A.g.* pAGIDP3a und *A.g.* pAGIDP3b auf verschiedenen Fettsäuren (A: 18:1 cis9, B: 18:2 cis9,12, C: 18:3 cis9,12,15)



30

Abb. 10 Verteilung der Enzyme Katalase und ICDH im Percoll-Dichtegradienten nach Zentrifugation von Organellen aus Myzel des Wildtyps (A) und der Mutante A.g. Δ IDP3b (B)

CTGCAGCAAACTGGTATGCCAACGAGGTGGACGTGCGGCGACGGGACCTGG - -661
 TGCATCCGGTACCGCAGAGTCGAGCACGGCACGACAAGTCGCGATCGCGCG - -601
 TGCAAGCAGCGCTGGCAACACCTCGAGCCCGGCCGGTATTCTACTGCGGCGATGGG - -541
 ATCAGCAGCTGAGCGCTGCGAAGGAATGCGACCTGCTGTTGCGAAGAGTGGCAAGGAC - -481
 CTGATCTCTCTGCAAGAAGCAGGACGTTCCGTCAGGCTCAACACTTTGACGAT - -421
 GTGCTGAGCGCGTCAAGCGCTGGTGGCGGGGAGGGCTCTGTCACGGAACCTCCAGGG - -361
 GGCTCCGCTGCGTAAGCACTGTCATCAGTGCACCTGGCGTAGCTGCAGTTGTAAC - -301
 TACCTACGTAATTAGTCTGCTCGCGTCCAGTGCTAGGCACGCCACATGAAA - -241
 GGCAGCCGTAAGCAATTAGTAAACGGCTAGTACGGCTCCGATGTATGTCAGCACATGA - -181
 CAGCCCACGGGTTGAGAAGTCCGGCTCGAATCATTCGCGCCGAGTGGTGTGGGTG - -121
 GAGCCGCCCCACCCCTGTCAGCGGGCAGTTGGATATAAGGCAGTGGTGTAGCAAA - -61
 GTGAGXTGCGTGCATTACGAAGCCGAGCGCAACAGCACAGACATCAGTAAGCAGCT - -1
 ATGGGCAAGGTGAAGGTACAACAACCCATCGCGAGATGGACGGCGACGAAACAGACGCGG - 60
 1 - M G K V K V Q Q P I V E M D G D E Q T R
 ATCATCTGGCACTTGATCAAGGATCAGCTCATCTTCCCCTACTTGGACGTGGACTTGAAG - 120
 21 - I I W H L I K D Q L I F P Y L D V D L K
 TACTACGATTTCCATTGAGAACACAGGGATGCCACCGAGGACCGCGTACTGTGGAGTCT - 180
 41 - Y Y D L S I E N R D A T E D R V T V E S
 61 - A E A T L K Y G V A V K C A I I T P D E
 GCGGAGGCACCCCTCAAGTACGGCGTGGCGTCAAGTGTGCGATTATTACCCGGACGAG - 240
 GCGCGTGTGAGGAGTTCGGGCTCAAGGAGATGTGAAAGTCTCCAACGGGACCATCCGG - 300
 81 - A R V E E F G L K E M W K S P N G T I R
 AACATCCTCGGGGACCGTCTTCAGAGAGCCCATTATTATCCAAGGATCCCCAGACTG - 360
 101 - N I L G G T V F R E P I I I P R I P R L
 GTGCCCGGCTGGAACGAGCCGATCATTGTCGGCAGACACGCGTTGGGACCAGTACAAG - 420
 121 - V P G W N E P I I V G R H A F G D Q Y K
 GCGACCGACGTTGTCATTCCAGGGCAGGGCACGTTGAAGCTGGCTTTGAAAGCAAGGAC - 480
 141 - A T D V V I P G E G T L K L V F E S K D
 GGGGACAAGTCCAAGAACATCTGACCTGGAGTTCTTGAATACCCCAAGGATGGCGGTGTT - 540
 161 - G D K S K N L D L E F F E Y P K D G G V
 GCCATGACCATGTACTACACCACCGACTCGATCACCGGCTTGCCAAGTCGAGCTCGAG - 600
 181 - A M T M Y Y T T D S I T G F A K S S F E
 TTGGCCTTCAAAGAAAGATGCCGCTATATTGACAACGAAGAACACGATCTTGAAGAAAG - 660
 201 - L A L Q R K M P L Y S T T K N T I L K K
 TACGACGGCAAGTTAAGGATATTCGAGGGCATGTACCCAGCGGAGTACAAGGAGAAG - 720
 221 - Y D G K F K D I F E G M Y P A E Y K E K
 TTTGAGGCTGCTGGCATCTGGTATGAACACAGACTGATTGACGATATGGTTGCGCAGATG - 780
 241 - F E A A G I W Y E H R L I D D M V A Q M
 TTGAAGTCCAAGGGCGGCTTCATCATTGCCATGAAGAACTACGATGGTGTGCGAGTCG - 840
 261 - L K S K G G F I I A M K N Y D G D V Q S
 GACATCGTCGCCAGGGCTTCGGGCTTGGGTCTCATGACTTCTGTTGTGCTCCA - 900
 281 - D I V A Q G F G S L G L M T S V L V S P
 GATGGAAAGACCTCGAGAGTGAGGCCACATGGCACTGTCAACCCGGCACTACAGACAG - 960
 301 - D G K T F E S E A A H G T V T R H Y R Q
 CACCAGCAGGGCAAGGAAACATCCACCAACTCTATTGCTCTATTGGCTGGATGCGC - 1020
 321 - H Q Q G K E T S T N S I A S I F A W M R
 GGTATTATACACAGAGGTAAAGTCGACGGTACCCAGATGTCGTGAAGTTGGCGAGTTG - 1080
 341 - G I I H R G K V D G T P D V V K F G E L
 TTGGAGAAGTCCACCCCTGGACACGGTGCAGGAGGACATGACCAAGGACCTAGCGTTG - 1140
 361 - L E K S T L D T V Q E D I M T K D L A L
 ATTTGGCAAGACCGACAGAGCCAGCTATGTTACCAACGGAAGAGTTATCACAGCAGTA - 1200
 381 - I L G K T D R A S Y V T T E E F I T A V

GCGAACCGCTTAGCGA - ACTACAAGCGTCTTTGTGAATAAGAA - GCAAGCAAAA - 1260
401 - A N R L A M A T S V F E V N K K K Q A K
TTATAGCCTAGGCTGCCGTAGCGTCTATTACTAGTCTAGCATATCTAGCACAGA - 1320
421 - L *
ATATAGATACTGAGCCATCCGCCAGGATTACAGTCAGGATTCCAACCTGAAACCTCCG - 1380
GTGGTGCGCACTCGCCCAAATTAGGTGAGCTTGCCTTGTACATCCGAGGCGCAGAATG - 1440
AGTAGGGTTTATAGTAAACCCGGGTGCTGTAACACCAGATCCCACCTTTCTGGCACAGT - 1500
ATTTTGCCGACAACGGCACTGCTAACCGTTCTCAACTACGCGCAATAATGTAGGTCGC - 1560
ACGGTCCGATGAAAACTAATGCGCAGTAGCATGACATGGAATTG - 1604

Abb.11 Nukleotidsequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des für die peroxisomale NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase codierenden *AgIDP3*-Gens aus *A. gossypii*.

Ansprüche

1. Ein- oder mehrzelliger Organismus, insbesondere Mikroorganismus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin
dadurch gekennzeichnet, daß dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species Ashbya gossypii ATCC10895.
- 10 2. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet, daß er eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität aufweist.
- 15 3. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz ist.
4. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz aus der Gattung Ashbya ist.
- 20 5. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz der Spezies Ashbya gossypii ist.
- 25 6. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit einer für die in Abb. 11 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariation kodierenden Nukleotidsequenz.
7. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach Anspruch 6 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1 bis 1262 gem. der Abb. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
30

8. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz mit Nukleotid - 661 bis -1 gem. der Abb. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
9. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
10. 10. Gen-Struktur enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9.
11. Vektor enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
12. Transformierter Organismus zur Herstellung von Riboflavin enthaltend in replizierbarer Form ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
13. Transformierter Organismus nach Anspruch 12 enthaltend einen Vektor nach Anspruch 11.
14. Verfahren zur Herstellung von Riboflavin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß ein Organismus gem. einem der Ansprüche 1 bis 5 eingesetzt wird.
15. Verfahren zur Herstellung eines Riboflavin produzierenden ein- oder mehrzelligen Organismus,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß er so verändert wird, daß dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Veränderung des Organismus mittels gentechnischer Methoden erfolgt.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Veränderung des Organismus durch Austausch des Promotors und/oder Erhöhung der Genkopienzahl erzielt wird.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß durch die Änderung des endogenen Isocitrat-Dehydrogenase-Gens ein Enzym mit erhöhter Aktivität erzeugt wird.
- 15 19. Verwendung des Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13 zur Herstellung von Riboflavin.
20. Verwendung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens nach einem der Ansprüche 6 bis 9 und der Gen-Struktur nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.
- 20 21. Verwendung des Vektors nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus, insbesondere Mikroorganismus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin 5 wobei dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

